



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A61K 48/00 // 31/70, 35/12, 35/28, 35/30, 38/02, 38/16, 38/19, 38/22, 38/43, 39/395</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/56368</p> <p>(43) 国際公開日 2000年9月28日(28.09.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01533</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月14日(14.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/78591 1999年3月23日(23.03.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP) 浅田起代蔵(ASADA, Kiyozo)(JP/JP) 〒520-3333 滋賀県甲賀郡甲南町希望ヶ丘3-20-9 Shiga, (JP) 上野充博(UENO, Mitsuhiro)(JP/JP) 〒525-0025 滋賀県草津市西浜川2丁目6-28 Shiga, (JP) 橋野仁一(HASHINO, Kimikazu)(JP/JP) 〒569-0082 大阪府高槻市明野町27-3 Osaka, (JP) 吉岡広文(YOSHIOKA, Hirofumi)(JP/JP) 〒525-0025 滋賀県草津市西浜川2丁目12-1 ハーモパレス草津311号 Shiga, (JP)</p>	<p>田中啓二(TANAKA, Keiji)(JP/JP) 〒520-0821 滋賀県大津市湖城ヶ丘4-10 Shiga, (JP)</p> <p>(74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: GENE THERAPEUTICS</p> <p>(54)発明の名称 遺伝子治療剤</p> <p>(57) Abstract Gene therapeutics to be used in treating diseases showing sensitivity to gene therapy, characterized by containing as the active ingredient an efficacious amount of a functional substance which has a function of having an affinity for a virus containing a gene usable in the gene therapy and another function of having an affinity specific for a target cell with a need for the gene transfer, or an efficacious amount of a functional substance which has an affinity for the above virus and an efficacious amount of another functional substance which has an affinity specific for the above cell.</p>		

(57)要約

遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤であって、遺伝子治療に有用な遺伝子を含むウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性とを有する有効量の機能性物質、又は該ウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質及び該標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子治療剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	NZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明 細 書

遺伝子治療剤

5 技術分野

本発明は、遺伝子治療を要する疾患の治療において有用で、生体内での標的細胞への選択的遺伝子導入に有用なミサイル遺伝子治療剤及びミサイル遺伝子治療方法に関する。

10 背景技術

15 遺伝子治療は、現在世界で3000例程実施されているが、最大の技術的問題は標的細胞、特に造血幹細胞への治療用遺伝子の導入効率が非常に低いことであった。しかし、近年フィブロネクチン断片の組換えタンパク質CH-296（宝酒造社製：レトロネクチン）を用いることにより、遺伝子導入効率が格段に改善され、遺伝子治療が現実のものとなってきた（ネイチャー・メディシン、第2巻、第876-882頁（1996））。この組換えレトロネクチンは治療用遺伝子を組み込んだレトロウイルスと標的細胞の両者をその分子上に結合して近接させることにより、遺伝子導入効率を大幅に上昇させることができ、これまで最も遺伝子導入が困難といわれてきヒト造血幹細胞においても約90%の効率で治療用
20 遺伝子の導入が認められる様になった。当該レトロネクチンは、造血幹細胞と特異的に結合するペプチドと治療用遺伝子が組み込まれたレトロウイルスベクターが特異的に結合するペプチドとがつながった1本のポリペプチドであるが、本発明者らはこれらの2つの部分を切断してそれぞれの部分をカクテルのように混合しても、元のレトロネクチン分子と同様の作用を示すことを明らかにしており、
25 これをカクテル遺伝子導入方法と命名している（WO97/18318号公報参照）。

上記のレトロネクチンを用いた造血幹細胞への遺伝子導入方法は、造血幹細胞への遺伝子の導入効率の向上において画期的な方法であるが、当該造血幹細胞への遺伝子導入を生体外で行い、遺伝子導入された造血幹細胞を生体に戻す方法で

あり、遺伝子治療において、その操作性に煩雑な面を有している。

また近年、遺伝子治療の標的細胞の多様化に対応する、標的細胞特異的遺伝子導入方法の提供が求められている。

5 非ウイルスベクター、例えばポリリジンなどを核酸保持用の担体に使用するベクターでは、細胞特異的な親和性を有するリガンドを付加して標的細胞への指向性を付与する試みが行われているが、この方法では導入された遺伝子を細胞に安定に保持させることはできない。また、ウイルスベクターの場合には、ウイルスエンベロープを標的細胞に親和性を有するリガンドとの融合タンパクとして発現させたものが知られている。しかし、その多くの試みはエンベロープ本来の感染機能またはリガンド本来の結合機能の片方または両方が融合発現のために損なわれてしまうことにより、目的とするターゲティングは達成されていない。また、上記の融合エンベロープを発現させるために煩雑なパッケージング細胞の構築を、しかも標的細胞の種類毎に行う必要があった。さらに、高タイターのウイルスベクター液を得ることのできるパッケージング細胞株の樹立、複製能を獲得したレトロウイルス (Replication Competent Retrovirus、RCR) が出現しないことの確認作業を強いられるなど、多大な実験準備時間が必要とされる。

15 上記のように、標的とする細胞に特異的に、しかも高い効率で目的の遺伝子を導入するためには現在の技術はなお種々の問題を有しており、その解決が望まれていた。

20 発明の目的

本発明の主な目的は生体内での遺伝子導入による遺伝子治療に有用な治療剤を提供し、当該治療剤を使用する、生体内での標的細胞に特異的な遺伝子導入による、簡便な遺伝子治療方法を提供することにある。

25 発明の概要

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤であって、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的

な親和性を有する機能性とを有する有効量の機能性物質を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子治療剤に関する。

本発明の第1の発明の治療剤としては、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを含有しても良く、例えば、当該ウイルスと上記の機能性物質が混合された状態、もしくは用時混合されうる状態で含有されていても良い。

第1の発明の治療剤において、機能性物質のウイルスに親和性を有する機能性についての限定はないが、抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンーII結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質由来である機能性が例示される。

また、第1の発明の治療剤において、機能性物質の標的細胞に特異的な親和性を有する機能性についての限定は無いが、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び細胞から選択される機能性物質由来である機能性が例示される。

本発明の第2の発明は、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤であって、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子治療剤に関する。

本発明の第2の発明の治療剤としては、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを含有しても良く、例えば、当該ウイルスとウイルスに親和性を有する機能性物質が混合された状態、もしくは用時混合されうる状態で含有されていても良い。

本発明の第2の発明の治療剤において、ウイルスに親和性を有する機能性物質に特に限定はないが、抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンーII結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質が例示される。

また、本発明の第2の発明の治療剤において、標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質に特に限定はないが、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び細胞から選択される機能性

物質が例示される。

本発明の第3の発明は、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療方法において、
遺伝子治療に有用な遺伝子を含むウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝
子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性とを有する有効量
5 の機能性物質を有効成分として投与することを特徴とする遺伝子治療方法に関す
る。

本発明の第3の発明の遺伝子治療方法においては、遺伝子治療に有用な遺伝子
を含む有効量のウイルスを投与すれば良く、その投与方法としては、当該ウ
イルスを本発明の治療剤と同時に投与しても良く、また時間をおいて投与しても
10 良い。

本発明の第3の発明の遺伝子治療方法において、機能性物質のウイルスに親和
性を有する機能性についての限定はないが、抗ウイルス抗体、フィブロネクチン
のヘパリンー I I 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまた
はそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質由来である機能性が例示さ
15 れる。

また、本発明の第3の発明の遺伝子治療方法において、機能性物質の標的細胞
に特異的な親和性を有する機能性に限定はないが、標的細胞親和性のタンパク質、
ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び細胞から選択さ
れる機能性物質由来である機能性が例示される。

本発明の第4の発明は、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療方法において、
遺伝子治療に有用な遺伝子を含むウイルスに親和性を有する有効量の機能性
物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他
の機能性物質を有効成分として投与することを特徴とする遺伝子治療方法に関す
20 る。

本発明の第4の発明においては、遺伝子治療に有用な遺伝子を含む有効量
のウイルスを投与すれば良く、その投与方法としては、当該ウイルスを本発明の
治療剤と同時に投与しても良く、また時間をおいて投与しても良い。

本発明の第4の発明の遺伝子治療方法において、ウイルスに親和性を有する機
能性物質に限定はないが、抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンー I I

結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質が例示される。

また本発明の第4の遺伝子療法において、標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質に限定はないが、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び代謝物から選択される機能性物質が例示される。

本発明の第5の発明は、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療用の遺伝子治療剤の製造における、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性とを有する有効量の機能性物質の使用に関する。

本発明の第6の発明は、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療用の遺伝子治療剤の製造における、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質の使用に関する。

本発明の第1又は第2の発明の治療剤、第3又は第4の発明の遺伝子治療方法、あるいは第5又は第6の発明の使用において、遺伝子導入の標的細胞に特に限定はないが、標的細胞としては、造血幹細胞、血液細胞、白血球、リンパ球、T細胞、ガン浸潤リンパ球、B細胞又はガン細胞が例示される。

本発明の第1又は第2の発明の治療剤、第3又は第4の発明の遺伝子治療方法、あるいは第5又は第6の発明の使用において、標的細胞に遺伝子導入される遺伝子は、遺伝子治療の目的で使用され得る遺伝子で有れば良く、特に限定はないが、導入される遺伝子によってコードされるタンパク質が、当該遺伝子が細胞中で発現されたとき治療に十分な量として発現される治療用タンパク質であれば良く、当該タンパク質としては、生体内酵素又はサイトカインが例示される。

本発明の第1又は第2の発明の治療剤、第3又は第4の発明の遺伝子治療方法、あるいは第5又は第6の発明の使用において、使用され得るウイルスとしては、臨床において治療手段として使用されうるウイルスであれば特に限定はなく、安全性の確認されたウイルスベクターを使用することができる。当該ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴

ウイルスベクター又はワクシニアウイルスベクター等が例示され、標的細胞への感染性、遺伝子導入効率より選択すればよい。

本発明者らは、標的細胞に親和性を有する機能性とウイルスに親和性を有する機能性とを利用することにより、生体内で遺伝子導入を行う標的細胞を自由に選
5 択でき、当該標的細胞にウイルスを利用した遺伝子導入が効率よく行われ、従来困難であった生体内での遺伝子導入のターゲッティング、すなわちミサイル遺伝子療法が可能となることを見出し本発明を完成した。

図面の簡単な説明

10 図1：HL60細胞をビークルに用いた遺伝子導入効率を示す図である。

発明の詳細な説明

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の治療剤を用いるミサイル遺伝子療法において使用されるウイルスベク
15 ターは特に限定はなく、通常、遺伝子導入操作に使用される公知のウイルスベクター、例えばレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター又はワクシニアウイルスベクター等が使用される。本発明には、好ましくは組換えレトロウイルスベクターが使用され、特に複製能欠損組換えレ
20 トロウイルスベクターが好適である。該ベクターは感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させてあり、非病原性である。これらのベクターは脊椎動物、特に哺乳類動物のような宿主細胞に侵入し、その染色体DNA中にベクターに挿入された遺伝子治療に有用な外来遺伝子を安定に組み込むことができる。

本発明では、生体内で標的細胞に遺伝子導入される遺伝子は、適当なプロモーター、例えば、ウイルスベクター中に存在するプロモーターや外来プロモーター
25 の制御下に発現されるように、組換えレトロウイルスベクター内に挿入して使用することができる。また、効率よい遺伝子の転写を達成するために、プロモーターや転写開始部位と共同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列やターミネーター配列がベクター内に存在していてもよい。さらに、臓器、腫瘍周辺など部位特異的に発現を制御するプロモーター、転写開始部位やこれらと共同する他

の調節要素をベクターに取り入れることで、標的部位における遺伝子発現の特異性をさらに高める事が出来る。導入される遺伝子は天然のものでも、または人工的に作製されたものでもよく、あるいは起源を異にするDNA分子が、ライゲーション等の公知の手段によって結合されたものであってもよい。

5 ウイルスベクターに挿入される遺伝子は、生体内で標的細胞中に導入することが望まれる任意の遺伝子を選ぶことができる。この様な遺伝子としては、例えば、治療の対象となる疾患に関連している酵素やタンパク質をコードするものの他、細胞内抗体(例えば、WO 94/02610号参照)、増殖因子、アンチセンス核酸、リボザイム、フォルスプライマー(例えば、WO 90/13641号参照)
10 等をコードするものを使用することができる。

本発明に使用されるウイルスに親和性を有する機能性物質としては、特に限定はなく、例えば、抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンーII結合領域、線維芽細胞増殖因子、V型コラーゲン、ポリリジン等があり、またこれらの機能性物質と機能的に同等な物質、例えば、ヘパリン結合性部位を有する機能性物質
15 も使用することができる。またこれらの機能性物質由来であっても良い。なお本発明において「機能性物質由来」とは使用する機能性物質分子中に、ウイルスに親和性を有する機能性物質の機能性部位が包含されていることを言う。また親和性(アフィニティー)とはウイルスとの結合性、細胞との接着性を含む概念である。本発明に使用する機能性物質のウイルスへの親和性により、特定の細胞、またはその細胞を含む臓器、器官、組織へのウイルスのターゲッティングが可能になり、特定の細胞への生体内での遺伝子導入による、遺伝子治療が可能となる。

ウイルスに特異的な親和性を有する抗体は、特定の標的細胞に特異的に、かつ高い効率で遺伝子を導入するうえで特に有用である。本発明に使用できる抗体としては特に限定はなく、遺伝子導入用のウイルス表面の抗原を認識する抗体を適宜選択し、使用することができる。該抗体は公知の方法によって作製することができるが、現在では多くの抗体が市販されており、これらを使用することもできる。これらの抗体は、使用するウイルスに対する結合能等所望の性質を有しているものであれば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のどちらでもよい。
25 さらに、公知技術により修飾された抗体や抗体の誘導体、例えば、ヒト化抗体、

F a b フラグメント、一本鎖抗体等を使用することもできる。

また、本発明に使用される標的細胞に親和性を有する機能性物質も、特に限定はないが、例えば、細胞親和性のタンパク質、ホルモンやサイトカイン、細胞表面の抗原に対する抗体、多糖類、糖タンパク質、糖脂質、糖タンパク質や糖脂質由来の糖鎖、標的細胞の代謝物、あるいは細胞などが挙げられる。またこれらの機能性物質由来の細胞結合部位であっても良い。当該「機能性物質由来」とは使用する機能性物質分子中に、標的細胞に親和性を有する機能性物質の機能性部位が包含されていることを言う。また標的細胞への親和性とは標的細胞との結合性、細胞との接着性を含む概念である。本発明に使用する機能性物質の標的細胞への親和性により、特定の細胞、またはその細胞を含む臓器、器官、組織へのウイルスのターゲッティングが可能になり、特定の細胞への生体内での遺伝子導入による、遺伝子治療が可能となる。

標的細胞に特異的に結合する抗体は、特定の標的細胞に高い効率で遺伝子を導入するうえで特に有用である。本発明に使用できる抗標的細胞抗体としては特に限定はなく、遺伝子を導入しようとする標的細胞で発現されている抗原に対する抗体を適宜選択し、使用することができる。該抗体は公知の方法によって作製することができるが、現在では多くの抗体が市販されており、これらを使用することもできる。これらの抗体は、標的細胞に対する特異性等所望の性質を有しているものであればモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のどちらでもよい。さらに、公知技術により修飾された抗体や抗体の誘導体、例えば、ヒト化抗体、F a b フラグメント、一本鎖抗体等を使用することもできる。

C D 抗原として知られている白血球抗原は、各抗原について種々の細胞における発現が詳細に調べられている。したがって、目的の標的細胞に発現している C D 抗原を認識する抗体を選び、これを本発明の遺伝子導入方法に用いることにより、標的細胞に高い特異性で遺伝子を導入することができる。例えば、抗 C D 4 抗体を使用した場合にはヘルパー T 細胞に、また抗 C D 3 4 抗体を使用した場合には造血幹細胞に、それぞれ遺伝子導入を方向づけることができる。

また、標的細胞親和性を有する機能性物質として細胞接着活性を有するタンパク質、例えばフィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン、ビトロネクチン等を使

用することができる。これらの機能性物質は、標的細胞に対する結合活性を有していれば、そのフラグメントであってもよい。

糖タンパク質であるラミニンは種々の標的細胞、例えば、血液系の細胞に効率よく遺伝子を導入するうえで有用である。また、ラミニンを使用した遺伝子導入では、その糖鎖が重要な役割を果たしている。従って、ラミニンより公知の方法で切り出した糖鎖も上記の機能性物質として使用することができる。また、ラミニンと同様の高マンノース型のN-結合型糖鎖を有する糖タンパク質や、これより切り出した糖鎖、さらに化学的に合成した該糖鎖を本発明に使用することもできる。さらに、上記の糖鎖をタンパク等の物質に結合させたものを使用することもでき、例えば、レトロウイルスに親和性を有する機能性物質に結合させたものは遺伝子導入に好適に使用できる。

上記のような機能性物質は天然起源の物質から得ることができ、また、人為的に作製する（例えば、組換えDNA技術や化学合成技術によって作製する）ことができ、さらに、天然起源の物質と人為的に作製された物質との組合せにより作製することもできる。

本発明の方法に使用されるフィブロネクチンやそのフラグメントは、例えば、ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（J. Biol. Chem.）第256巻、第7277頁（1981年）、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー（J. Cell. Biol.）、第102巻、第449頁（1986年）、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、第105巻、第489頁（1987年）に記載の方法によって、天然起源の材料から実質的に純粋な形態で製造することができる。また、米国特許第5,198,423号に記載の方法により、組換えDNA技術を利用して製造することもできる。特に、レトロウイルス結合部位であるヘパリンーII領域を含むフィブロネクチンフラグメント、例えば、前出のCH-296（レトロネクチン）、およびH-271、H-296、CH-271等の組換えポリペプチド、ならびにこれらを取得する方法はこの特許に詳細に記載されている。これらのフラグメントは上記公報に記載されているように、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-10721（H-296）（原寄託日：平成1年（1989年）5月12日）、FER

M BP-2799 (CH-271) (原寄託日：平成1年(1989年)5月12日)、FERM BP-2800 (CH-296) (原寄託日：平成1年(1989年)5月12日) およびFERM BP-2264 (H-271) (原寄託日：平成1年(1989年)1月30日) の受託番号のもとで寄託された大腸菌を培養することによって入手することができる。また、これらのフラグメントから定型的に誘導できるフラグメントは上記の大腸菌に保持されているプラスミドを公知の遺伝子組換え手法で改変することにより、作製することができる。

例えば、上記のフィブロネクチンフラグメントのうち、CH-296、CH-271はVLA5に対するリガンドを、また、CH-296、H-296はVLA4に対するリガンドを有しており、それぞれVLA5、VLA4を発現する細胞へのターゲッティングに有用である。例えば、VLA4に対するリガンドを有する機能性物質は造血幹細胞への遺伝子導入に有用である。

標的細胞に親和性を有する機能性物質として細胞を使用することもできる。細胞のあるものは臓器、器官、組織、あるいは細胞に対して特異的な親和性を有しており、生体内においてウイルスベクターを標的細胞に感染させるための運搬体(ビークル)として有用である。細胞をビークルとして使用する標的細胞への遺伝子ターゲッティングを以下に例示する。

1. 血管内皮細胞をビークルとして使用する遺伝子導入

血管内皮細胞は新たな血管の形成が起こっている部位に特異的に集積される性質を有している。この性質を利用し、血管内皮細胞をビークルとして遺伝子のターゲッティングを行うことができる。

ガン細胞は自身の増殖のために、その周辺に血管新生を誘導し、その血管より栄養を取り入れたり老廃物を排出したりする。上記の血管内皮細胞の性質を利用してガン細胞周辺の血管新生部位にウイルスベクターを運び、ガンの治療を行うことができる。例えば、治療のための遺伝子としては自殺遺伝子(HSV-TK等)を導入して直接ガン組織を攻撃してもよいし、血管新生を阻害するような遺伝子を導入することによってガン細胞の栄養摂取を阻み、ガンを退縮させてもよい。このようなガン治療は、従来行われてきた化学療法や放射線治療と比べ副作

用はみられない。また、手術による患者の物理的負担は本発明の遺伝子治療剤の接種という簡単な処置により劇的に軽減される。

また、脳梗塞、心筋梗塞による血管バイパス手術後、虚血状態を克服するためには側副血行路の発達を促進させることが好ましい。このような場合、血管内皮細胞をビークルとして手術部位周辺の血管新生部位に血管新生の促進に關与する遺伝子の導入を行うことで虚血状態が改善される。

2. 炎症細胞をビークルとして使用する炎症組織への遺伝子導入

アレルギー性炎症、例えば気管支喘息の場合、炎症細胞は血管内腔より血管壁に接着し、さらに経血管内皮細胞間移動の後、間質内に移行して気道粘膜で炎症を惹起する。このように炎症の場に炎症細胞が集積される性質を利用して治療ができる。ビークルとして使用可能な炎症細胞としては好酸球、マスト細胞、リンパ球等が挙げられる。たとえば、集積の最初のステップである炎症細胞の血管壁接着において、血管内皮細胞に接着阻害に關連する遺伝子を導入すると、それ以後、炎症細胞の接着が阻害され集積がおこらない。

3. 造血幹細胞をビークルとする骨髓微小環境への遺伝子導入

造血幹細胞は骨髓微小環境にホーミングする性質を有しており、これを利用して遺伝子のターゲッティングを行うことができる。ウイルスベクターとともに造血幹細胞が骨髓微小環境にホーミングした際、隣接する別の造血幹細胞やストロマ細胞のような骨髓微小環境を構成する細胞等、骨髓微小環境に有用遺伝子を導入することができる。

4. 脳内皮細胞をビークルに用いる脳腫瘍への遺伝子導入

脳由来の内皮細胞にウイルスベクターを結合させ、脳腫瘍部位へのターゲッティングを行うことができる。特にレトロウイルスベクターは分裂中の細胞に高い効率で感染する性質を有しており、分裂していない腫瘍周辺の正常細胞には感染することなく、脳腫瘍特異的に治癒遺伝子を運ぶことができる。

5. 組織再生能力をもつ細胞をビークルに用いる遺伝子導入

最近、骨髓細胞による血管再生が報告され、これを利用した心筋梗塞治療がおこなわれている。心筋に骨髓細胞を注入することで梗塞状態の心筋血流が改善される。この性質を利用し、有用な遺伝子、例えば血管新生促進遺伝子を組込んだ

ウイルスベクターを骨髄細胞に運ばせれば、導入された遺伝子との相乗効果により血管再生能力が劇的に上昇する。また、間末性幹細胞（mesenchymal stem cells）のように骨、軟骨、腱、脂肪細胞、骨格筋、ストローマ細胞への分化再生能力を持つ骨髄細胞を目的に合わせた治療用遺伝子の運搬に用いる事で、上記
5 の組織、細胞の再生促進や部位特異的治療などに利用できる。

本発明に使用する機能性物質としては、上記のウイルスに親和性を有する機能性物質と、標的細胞に親和性を有する機能性物質から構成されるものが挙げられる。例えば、標的細胞に特異的な親和性を有する抗標的細胞抗体とウイルスに特異的な親和性を有する抗ウイルス抗体よりなる機能性物質、標的細胞に特異的な
10 親和性を有する糖鎖とウイルスに特異的な親和性を有する抗ウイルス抗体よりなる機能性物質、標的細胞に特異的な親和性を有する細胞とウイルスに特異的な親和性を有するポリペプチドよりなる機能性物質等が例示され、これらの機能性物質を使用することによって、種々の細胞が混在する生体内において、特定の細胞だけを狙った遺伝子導入が可能となる。特に、糖鎖は、細胞の顔といわれている
15 ように、細胞の多様な性質を決定し、細胞は相互に多彩な糖鎖を通じて認識し相互作用している。従ってこの糖鎖の特異性を利用する、遺伝子導入のターゲティングは、抗体の特異的結合力と合わせ、生体内における最も高精度なミサイル遺伝子療法を可能にする。

また、細胞をビークルとして使用する本発明の遺伝子治療剤としては、例えば、
20 上記のようなウイルスベクターに対する親和性を有する機能性物質を標的細胞に特異的な親和性を有する細胞に結合させたものがある。該機能性物質を細胞に結合させる方法としては、当該機能性物質を化学的に細胞に結合させる方法や、ウイルスベクターに対する親和性とビークルとして使用する細胞に特異的な親和性とを併せ持つ機能性物質を使用する方法等が挙げられる。

さらに、ウイルスベクターに特異的な親和性と標的細胞に特異的な親和性とを有する細胞をビークルとして利用することができる。このような細胞としては、本来、上記の性質を併せ持つようなネイティブな細胞を使用することができ、また、上記の2種類の親和性のいずれか、もしくは両方を人工的に付与したものであってもよい。標的細胞特異的な親和性は、標的細胞の有するレセプターに対す
25

るリガンドや標的細胞表面抗原に対する抗体等、上記の標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質を細胞表面に強制発現させて付与することができる。また、ウイルスベクターに対する親和性も、上記のウイルスベクターに特異的な親和性を有する機能性物質をビークル細胞表面に発現させることにより、同様に付与することができる。

本発明の遺伝子治療剤を投与しようとする患者自身から調製されたビークル細胞は免疫などによる排除を受けることはなく、治療の目的に特に好適である。また、患者自身から調製できない場合には、他人、もしくは他の動物由来の細胞を用いてもよい。そのような場合には、予め放射線照射や薬剤などにより細胞を処理しておけば、生体への投与後一定の時間が経過して細胞分裂が始まると当該細胞は増殖することなく消滅する。このような細胞はウイルスベクターの運搬の目的には十分な機能を有している。

さらに、ビークル細胞と標的細胞間の相互作用、例えばシグナル伝達等を利用し、標的細胞がウイルスベクターの感染を受けやすくなるような状態（例えば細胞周期が回転する等）を作り、遺伝子導入効率をさらに向上させることも可能である。

遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性を有する有効量の機能性物質を有効成分として、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤を製造することができる。また、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質を有効成分として、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤を製造することができる。

本発明の治療剤としては、上記のそれぞれの有効量の機能性物質を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せて製剤化すればよい。当該治療剤は注射剤、点滴用剤として投与することができる。

治療剤としての投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが一般には

製剤中に含有される有効成分の量が成人1日当り $10\mu\text{g} \sim 200\text{mg/kg}$ である。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。

5 本発明の有効量の治療剤を有効成分として投与することを特徴とする、本発明の遺伝子治療方法が提供される。

本発明の遺伝子治療方法においては、ウイルス親和性を有する機能性物質に、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを結合させた状態で投与しても良く、また生体内で当該ウイルスが当該ウイルス親和性を有する機能性物質に親和するように投与しても良い。いずれにしても生体内で標的細胞への遺伝子導入が効率よく行われるように設定すれば良い。

10 なお、本発明を特に限定するものではないが、投与に際しては、本発明の遺伝子治療剤が標的細胞に到達するのに適した方法を選択することが好ましい。

本発明により、遺伝子導入の標的となる細胞も特に制限はなく、例えば、幹細胞 (stem cells)、造血細胞、非接着性低密度単核細胞、接着性細胞、骨髓細胞、造血幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血液細胞、胎児性造血幹細胞、胚形成幹細胞、胚細胞、プライモディアル・ジャーム・セル (primordial germ cell)、卵母細胞、卵原細胞、卵子、精母細胞、精子、CD34+細胞、C-kit+細胞、多能性造血前駆細胞、単能性造血前駆細胞、赤血球系前駆細胞、リンパ球母細胞、成熟血球、血液細胞、白血球、リンパ球、B細胞、T細胞、ガン浸潤リンパ球、線維芽細胞、神経芽細胞、神経細胞、内皮細胞、血管内皮細胞、肝細胞、筋芽細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、ガン細胞、骨髓腫細胞及び白血病細胞等が例示される。

20 造血幹細胞を標的とした遺伝子治療としては、患者において欠損しているか、異常が見られる遺伝子を補完するものがあり、例えば、ADA (アデノシンデアミナーゼ) 欠損症 (米国特許番号5399346号公報参照) やゴーシェ病の遺伝子治療がこれにあたる。この他、例えば、ガンや白血病の治療に使用される化学療法剤による造血細胞の障害を緩和するために、造血幹細胞への薬剤耐性遺伝子の導入が行われることがある。

25 また、ガンの遺伝子治療法としては、ガン細胞にチミジンキナーゼ遺伝子のよ

うな自殺遺伝子を導入した後に薬剤を投与して細胞を死滅させる治療法が研究されている〔サイエンス、第256巻、第1550～1552頁（1992年）〕。さらに、AIDSを遺伝子治療法によって治療しようという試みも行われている。この場合には、AIDSの原因であるHIV（ヒト免疫不全ウイルス）の感染するT細胞に、HIVの複製や遺伝子発現を妨げるような核酸分子（アンチセンス核酸やリボザイム等）をコードする遺伝子を導入することが考えられている〔例えば、ジャーナル・オブ・ウイロロジー、第69巻、第4045～4052頁（1995年）〕。本発明による標的細胞特異的な遺伝子導入は、上記のような遺伝子治療の効率を向上させることができる。

以上に詳細に説明したように、本発明の治療剤、治療方法により生体内での標的細胞への特異的な遺伝子導入により、遺伝子治療を要する疾病の治療が可能となる。なお、本発明の治療剤を生体内に投与してもその生理的有効濃度の範囲において急性毒性は認められない。

実施例

以下に実施例を挙げて、さらに詳しく本発明を説明するが、本発明は下記実施例の範囲のみに限定されるものではない。

実施例 1

（1）8週令のC3H/HeJマウス（日本SLC社より購入）に、EPHA-5産生細胞（ネイチャー・メディシン、第2巻、第876～882頁（1996））によって産生されたヒトADA遺伝子（hADA）を含有するPGKベクターであるPGK-hADAベクター（ネイチャー・メディシン、第2巻、第876～882頁（1996））、及び実施例2に記載のレトロネクチン注射剤を尾静脈中に注射した。造血幹細胞への形質導入は、ネイチャー・メディシン、第2巻、第876～882頁（1996）に従い、遺伝子導入マウスにおける形質導入されたヒトADA cDNAの発現を試験することにより分析した。すなわち、マウス末梢血細胞中のヒトADAタンパク質の存在を酢酸セルロース電気泳動により検出するADAアイソザイム分析により確認した。試験は、移植後4ヶ月の初めに実施し、そして毎月繰り返した。

(2) アイソザイム分析による9ヶ月後の形質導入骨髄の被移植体の分析によってレトロネクチンとPGK-hADAベクターを投与したマウスにおいて、ヒトADA cDNAの発現を確認した。なお対照のマウスではヒトADAは検出されなかった。

5

実施例2

レトロネクチン (CH-296、宝酒造社製) を 2 mg/ml となるように注射用水に溶解した後、生理食塩水で平衡化し、注射剤を作成した。

10

実施例3 HL60細胞をビークルに用いた遺伝子導入

ポリペプチドCH-271は以下に示す方法により調製した。すなわち、大腸菌、*Escherichia coli* HB101/pCH101 (FERM BP-2799) を用い、これを米国特許第5,198,423号公報に記載の方法で培養し、該培養物よりCH-271を得た。

15

ヒト白血病細胞HL60 (大日本製薬社より購入) を10% 仔ウシ胎児血清 (FCS: バイオウイッタカー社製) を含むD-MEM培地 (バイオウイッタカー社製) に $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ となるように調製した。細胞懸濁液1 mlに最終濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ のレトロネクチンTM (宝酒造社製) または上記のCH-271を添加した。さらにこれらの機能性物質を添加しない対照群も準備した。

20

上記の細胞に、 $6.23 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$ の Enhanced green fluorescent protein (EGFP) 遺伝子を持つエコトロピックレトロウイルスベクター [pLEIN (クロンテック社製): GPE-86細胞 (ATCC CRL-9642) を使用して調製] を含む溶液 $100 \mu\text{l}$ を添加し、5% CO₂ インキュベーター中、37℃で30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を10% FCSを含むD-MEM培地で2回遠心洗浄し、細胞に吸着しなかったウイルスベクターを取り除いた。遠心洗浄後、10% FCSを含むD-MEM培地1 mlに懸濁した。

25

こうして得られたHL60細胞 ($2 \times 10^6 \text{ cells}$ 相当) を、 2×10^5

cell 相当の NIH/3T3 細胞 (ATCC CRL-1658) を培養して
おいた 6 穴細胞培養用プレート (ファルコン社製) 上加えた。この細胞を 5 %
CO₂ インキュベーター中、37℃ で 2 日間インキュベートした。培養後、プレ
ートに接着している NIH/3T3 細胞を回収し、FACS Vantage (ベ
5 クトンディキンソン社製) を使用したフローサイトメトリー (励起波長 488 nm、
蛍光波長 515 ~ 545 nm) により EGFP 発現細胞の解析を行い、遺伝
子導入効率 (全細胞に対する EGFP 発現細胞の割合) を算出した。実験結果を
図 1 に示す。

図 1 に示されるように、HL60 細胞にレトロネクチン (CH-296) を添
10 加した群でのみ有意な GPE+86/EGFP レトロウイルスベクター由来の EGFP
遺伝子の発現が確認され、遺伝子導入が起こっていることが示された。す
なわち、レトロウイルスベクターがレトロネクチンを介して HL60 細胞に吸着
され、該細胞とともに標的細胞である NIH/3T3 細胞に接近し、ついで標的
細胞に感染しうるということが明らかとなった。レトロネクチンを介して細胞に吸着さ
15 れたウイルスベクターは遠心処理、洗浄処理によっても脱離することはなく、ま
た吸着によって感染能力が失われることもなかった。このように、レトロネクチ
ンを細胞懸濁液中に添加するだけで簡便にウイルス吸着能力を有するビークル細
胞を作成することができた。

レトロネクチンは VLA5 に対するリガンドに加えて HL60 細胞で発現して
20 いる VLA4 に対するリガンド (CS-1) を有しているのに対し、CH-27
1 の有するリガンドは HL60 では発現量の低い VLA5 に対するものであり、
これが遺伝子導入効率の差として現れたと考えられる。このことは、用いる細胞
と組み合わせるウイルスに親和性を有する機能性物質、たとえばフィブロネクチ
ンのフラグメントを適切に選択することによって、複数種類の細胞が混在する状
25 態であっても所望のビークル細胞に特異的にウイルスに対する親和性を付与する
ことが可能であることを示した。

実施例 4 血管内皮細胞をビークルに用いた遺伝子導入

5 × 10⁵ cells の血管内皮細胞 (HUVEC: バイオウィタカー社より

購入)を含有する $200\mu\text{l}$ のD-MEM培地(バイオウィタカー社製、10%のFBSを添加して使用)に終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のレトロネクチンを添加した。また、レトロネクチンを添加しない対照群も準備した。

上記の細胞に、 $7.75\times 10^6\text{cfu}/\text{ml}$ のGPE+86/EGFPレトロウイルスを含む溶液 $200\mu\text{l}$ を添加し、5% CO_2 インキュベーター中、 37°C で30分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を10%FCSを含むD-MEM培地で2回遠心洗浄し、細胞に吸着しなかったウイルスベクターを取り除いた。遠心洗浄後、10%FCSを含むD-MEM培地 $100\mu\text{l}$ に懸濁した。上記の方法により調製したHUVEC($5\times 10^5\text{cells}$ 相当)を $500\mu\text{l}$ のRPMI1640培地(バイオウィタカー社製、10%のFBSを添加して使用)中でL1210細胞($1\times 10^5\text{cells}$ 相当)

(大日本製薬社より購入)と混合し、24穴プレート(ファルコン社製)に移した。この細胞を5% CO_2 インキュベーター中、 37°C で4日間インキュベートした。

培養終了後の細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、HUVECの固まりの周囲をL1210細胞が取り巻いているのが観察された。このことからHUVECがL1210細胞に対して親和性を有していることが明らかとなった。また、HUVECの周囲のL1210細胞ではEGFPに由来する蛍光が観察され、これらの細胞に遺伝子導入が起こっていることが明らかとなった。なお、レトロネクチンを添加せずに上記の操作を行ったものでは、L1210細胞がHUVECを取り巻いているのは観察されたが、蛍光は観察されなかった。

以上のことより、HUVECとレトロネクチンのような機能性物質とを組み合わせ、標的細胞への遺伝子ターゲティングが可能なが示された。

実施例5 血管内皮細胞のホーミング

Adenovirus Expression Vector Kit(宝酒造社製)を使用し、該キットに添付のLacZ遺伝子を有するコントロールプラスミドpAxCALacZが組み込まれたアデノウイルスベクターAxCALacZを調製した。次に、10cm径のプレート(ファルコン社製)上ではほぼコンフルエントに培養したHUVECに、上記のアデノウイルスベクターAxCALacZ

i L a c Z を m . o . i . = 1 0 で感染させ培養を継続した。感染培養 3 日後に細胞を回収し L a c Z - H U V E C とした。

あらかじめ 1×10^6 個のマウス繊維肉腫細胞株 M e t h - A (理化学研究所より分譲、RCB 0464) を s c i d m o u s e (日本クレア社より入手) 皮下に移植した。移植後 5 日目に 2×10^6 個相当の L a c Z - H U V E C を尾静脈より接種した。接種後 7 日目に上記のマウスより腫瘍、腫瘍に接して血管新生がみられる腹膜 (腹壁ごと) および各種臓器 (肝臓、脾臓、心臓、腎臓、肺) を摘出し、そのそれぞれを X - g a l (宝酒造社製) を使用して染色し、L a c Z - H U V E C の局在性を調べた。また、使用した L a c Z - H U V E C が L a c Z 遺伝子を有していることを確認するために、該細胞の一部をマウスへの接種時よりプレート上で培養し、上記の腫瘍、腹膜、臓器と同じ時期に X - g a l で染色した。

プレート上で培養した L a c Z - H U V E C は X - g a l によって青く染まり、L a c Z 遺伝子を保持していることが確認された。摘出された腫瘍および腹膜には X - g a l 染色によって青く染まる部位が見られた。特に腹膜では新生血管部位にそって線状に青く染まる部位がみられ、新生血管部位に L a c Z - H U V E C が局在していることが確認された。さらに腫瘍の一部にも青く染まる部位が見られた。すなわち、投与された H U V E C が新生血管部位に選択的に集積されることが明らかとなった。

以上より、H U V E C が腫瘍形成部位、血管新生部位への遺伝子導入においてビークルとして使用可能であることが示された。

産業上の利用の可能性

本発明により生体内において、標的細胞への遺伝子導入のターゲティングが可能で、目的の標的細胞に特異的に遺伝子導入を行い、その結果、遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に有用な治療及び当該治療剤が提供される。またこの治療剤を投与することによる遺伝子治療方法が提供され、生体内での標的細胞への遺伝子導入による遺伝子治療方法を提供する。

請 求 の 範 囲

1. 遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤であって、
5 遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性とを有する有効量の機能性物質を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子治療剤。

2. 遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを含有することを特徴とする請求項 1 記載の遺伝子治療剤。

3. ウイルスに親和性を有する機能性が、抗ウイルス抗体、フィブロネクチンの
10 のヘパリンー I I 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質由来である請求項 1 又は 2 記載の遺伝子治療剤。

4. 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性が、標的細胞親和性のタンパク
15 質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び細胞から選択される機能性物質由来である請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療剤。

5. 血管内皮細胞、炎症細胞、造血幹細胞、脳内皮細胞、骨髄細胞から選択される細胞由来の、標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質を使用する請求
20 項 1 ～ 4 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療剤。

6. 機能性物質として、標的細胞に特異的な親和性を有する細胞を使用する請求
20 項 1 記載の遺伝子治療剤。

7. 機能性物質として、血管内皮細胞、炎症細胞、造血幹細胞、脳内皮細胞、
骨髄細胞から選択される細胞を使用する請求項 6 記載の遺伝子治療剤。

8. 遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療に使用する遺伝子治療剤であって、
25 遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質を有効成分として含有することを特徴とする遺伝子治療剤。

9. 遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを含有することを特徴とする請求項 8 記載の遺伝子治療剤。

10. ウイルスに親和性を有する機能性物質が、抗ウイルス抗体、フィブロネ

クチンのヘパリンー I I 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質である請求項 8 又は 9 記載の遺伝子治療剤。

1 1. 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質が、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び細胞から選択される機能性物質である請求項 8 ～ 1 0 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療剤。

1 2. 機能性物質として、標的細胞に特異的な親和性を有する細胞を使用する請求項 1 1 記載の遺伝子治療剤。

1 3. 機能性物質として、血管内皮細胞、炎症細胞、造血幹細胞、脳内皮細胞、骨髓細胞から選択される細胞を使用する請求項 1 2 記載の遺伝子治療剤。

1 4. 遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療方法において、遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性とを有する有効量の機能性物質を有効成分として投与することを特徴とする遺伝子治療方法。

1 5. 遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを投与することを特徴とする請求項 1 4 記載の遺伝子治療方法。

1 6. ウイルスに親和性を有する機能性が抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンー I I 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質由来である請求項 1 4 又は 1 5 記載の遺伝子治療方法。

1 7. 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性が、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び細胞から選択される機能性物質由来である請求項 1 4 ～ 1 6 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療方法。

1 8. 血管内皮細胞、炎症細胞、造血幹細胞、脳内皮細胞、骨髓細胞から選択される細胞由来の、標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質を使用する請求項 1 4 ～ 1 7 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療方法。

1 9. 機能性物質として、標的細胞に特異的な親和性を有する細胞を使用する

請求項 1 4 記載の遺伝子治療方法。

2 0. 機能性物質として、血管内皮細胞、炎症細胞、造血幹細胞、脳内皮細胞、骨髄細胞から選択される細胞を使用する請求項 1 9 記載の遺伝子治療方法。

5 2 1. 遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療方法において、遺伝子治療に有用な遺伝子を含むウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質を有効成分として投与することを特徴とする遺伝子治療方法。

2 2. 遺伝子治療に有用な遺伝子を含む有効量のウイルスを投与することを特徴とする請求項 2 1 記載の遺伝子治療方法。

10 2 3. ウイルスに親和性を有する機能性物質が抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンー I I 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまたはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質である請求項 2 1 又は 2 2 記載の遺伝子治療方法。

15 2 4. 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質が、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び細胞から選択される機能性物質である請求項 2 1 ～ 2 3 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療方法。

2 5. 機能性物質として、標的細胞に特異的な親和性を有する細胞を使用する請求項 2 1 記載の遺伝子治療方法。

20 2 6. 機能性物質として、血管内皮細胞、炎症細胞、造血幹細胞、脳内皮細胞、骨髄細胞から選択される細胞を使用する請求項 2 5 記載の遺伝子治療方法。

25 2 7. 遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療用の遺伝子治療剤の製造における、遺伝子治療に有用な遺伝子を含むウイルスに親和性を有する機能性と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する機能性とを有する有効量の機能性物質の使用。

2 8. 遺伝子治療剤が遺伝子治療に有用な遺伝子を含む有効量のウイルスを含むことを特徴とする請求項 2 7 記載の使用。

2 9. ウイルスに親和性を有する機能性が抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンー I I 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジンまた

はそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質由来である請求項 27 又は 28 記載の使用。

30. 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性が、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び細胞から
5 選択される機能性物質由来である請求項 27～29 のいずれか 1 項記載の使用。

31. 血管内皮細胞、炎症細胞、造血幹細胞、脳内皮細胞、骨髓細胞から選択される細胞由来の、標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質を使用する請求項 27～30 のいずれか 1 項記載の使用。

32. 機能性物質として、標的細胞に特異的な親和性を有する細胞を使用する
10 請求項 27 記載の使用。

33. 機能性物質として、血管内皮細胞、炎症細胞、造血幹細胞、脳内皮細胞、骨髓細胞から選択される細胞を使用する請求項 32 記載の使用。

34. 遺伝子治療に感受性を示す疾患の治療用の遺伝子治療剤の製造における、
15 遺伝子治療に有用な遺伝子を含有するウイルスに親和性を有する有効量の機能性物質と、遺伝子導入を必要とする標的細胞に特異的な親和性を有する有効量の他の機能性物質の使用。

35. 遺伝子治療剤が遺伝子治療に有用な遺伝子を含有する有効量のウイルスを含有することを特徴とする請求項 34 記載の使用。

36. ウイルスに親和性を有する機能性物質が抗ウイルス抗体、フィブロネクチンのヘパリンー I I 結合領域、線維芽細胞増殖因子、コラーゲン、ポリリジン
20 またはそれらと機能的な同等物から選択される機能性物質である請求項 34 又は 35 記載の使用。

37. 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質が、標的細胞親和性のタンパク質、ホルモン、サイトカイン、抗標的細胞抗体、糖鎖、炭水化物及び細胞
25 から選択される機能性物質である請求項 34～36 のいずれか 1 項記載の使用。

38. 機能性物質として、標的細胞に特異的な親和性を有する細胞を使用する請求項 34 記載の使用。

39. 標的細胞に特異的な親和性を有する機能性物質として、血管内皮細胞、炎症細胞、造血幹細胞、脳内皮細胞、骨髓細胞から選択される細胞を使用する請

求項 3 8 記載の使用。

4 0. 標的細胞が造血幹細胞、血液細胞、白血球、リンパ球、T細胞、ガン浸潤リンパ球細胞、B細胞又はガン細胞である請求項 1 ～ 3 9 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療剤、遺伝子治療方法又は使用。

5 4 1. 標的細胞が造血幹細胞、血液細胞、白血球、リンパ球、T細胞、ガン浸潤リンパ球細胞、B細胞又はガン細胞である請求項 1 ～ 4 0 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療剤、遺伝子治療方法又は使用。

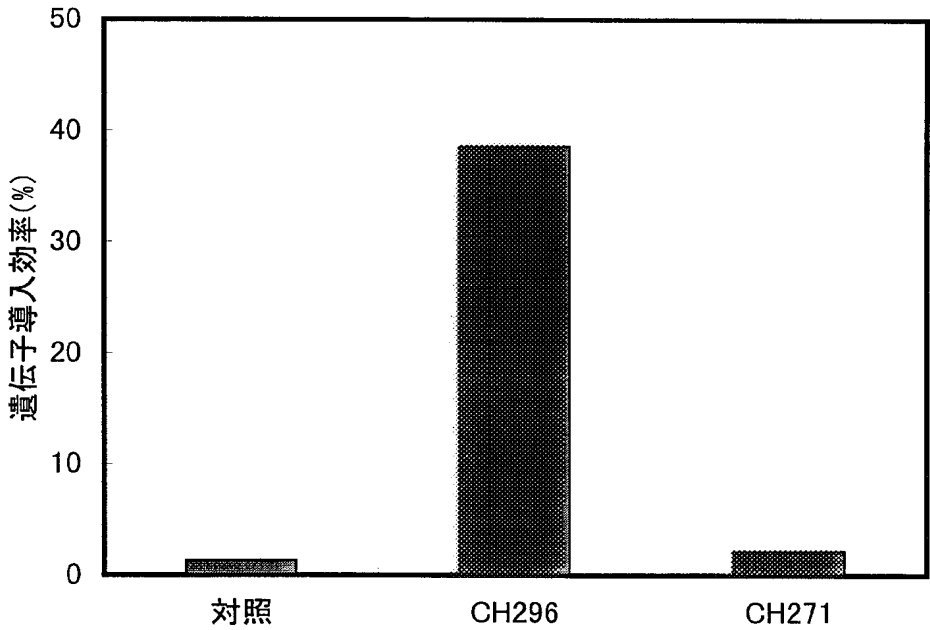
10 4 2. 導入される遺伝子によってコードされるタンパク質が、遺伝子が細胞中で発現されたとき治療に十分な量として発現される治療用タンパク質である請求項 1 ～ 4 1 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療剤、遺伝子治療方法又は使用。

4 3. タンパク質が酵素又はサイトカインである請求項 4 2 記載の遺伝子治療剤、遺伝子治療方法又は使用。

4 4. ウイルスがウイルスベクターである請求項 1 ～ 4 3 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療剤、遺伝子治療方法又は使用。

15 4 5. ウイルスベクターがレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター又はワクシニアウイルスベクターである請求項 1 ～ 4 4 のいずれか 1 項記載の遺伝子治療剤、遺伝子治療方法又は使用。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01533

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K48/00 //A61K31/70, 35/12, 35/28, 35/30, 38/02,
38/16, 38/19, 38/22, 38/43, 39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K48/00, 31/70, 35/12-35/30, 38/02-38/43, 39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN),
JICST (JOIS), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Makoto Migita, et al., "Retrovirus Vector ni yoru Zouketsu Kansaibou e no Idenshi Dounyuu no Shiteki Jouken no Kentou - Kotsuzui Stroma Saibou to Fibronectin Fragment (CH-296) no Hikaku-", Kokuritsu Seishin · Shinkei Center Uneibu Kikakushitsu ed., "Heisei 9 nendo Kouseishou Seishin · Shinkei Shikkan Kenkyuu Itakuhi ni yoru Kenkyuu Houkokushuu (2 Nendo Han · Shonendo Han)", 1998, p.401	1-13, 27-41, 44, 45
Y		42, 43
X	JP, 10-507074, A (Neurotec SA), 14 July, 1998 (14.07.98), Claims; page 6, lines 3 to 5	1-7, 27-33, 40-45
Y	& WO, 96/11278, A1 & EP, 787197, A1 & FR, 2726005, A1 & AU, 9536575, A & NZ, 293994, A	8-13, 34-39
X	WO, 95/31566, A1 (VIAGENE, INCORPORATED), 23 November, 1995 (23.11.95), Claims; page 25, line 30 to page 28, line 18	1-5, 8-11, 27-31, 34-37, 40-45
Y	& JP, 9-509329, A Claims; page 44, line 3 to page 47, line 3 & EP, 759087, A1 & AU, 9525896, A	6, 7, 12, 13, 32, 33, 38, 39

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 May, 2000 (23.05.00)

Date of mailing of the international search report
06 June, 2000 (06.06.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01533

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, 5830880, A (Hoechst Aktiengesellschaft), 03 November, 1998 (03.11.98), Claims; Column 11, line 37 to Column 12, line 29 & JP, 10-506526, A	1-5,8-11, 27-31,34-37, 40-45
Y	Claims; page 26, the last line to page 28, line 8, & WO, 96/06940, A1 & EP, 804601, A1 & AU, 9534732, A & FI, 9700768, A & KR, 97705638, A	6,7,12,13, 32,33,38,39
X	EP, 870839, A1 (TAKARA SHUZO CO. LTD.), 14 October, 1998 (14.10.98), Claims; page 12, lines 26 to 56	1-5,8-11, 27-31,34-37, 40-45
Y	& WO, 97/18318, A1 Claims; page 33, line 16 to page 35, line 9 & MX, 9803706, A1 & AU, 6975058, A & CN, 1207774, A	6,7,12,13, 32,33,38,39
X	JP, 10-505234, A (Hoechst Aktiengesellschaft), 26 May, 1998 (26.05.98), Claims; page 21, line 12 to page 23, line 14	1-5,8-11, 27-31,34-37, 42-45
Y	& WO, 96/06939, A1 & EP, 777740, A1 & AU, 9535185, A	6,7,12,13, 32,33,38-41
X	WO, 95/26200, A1 (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION), 05 October, 1995 (05.10.95), Claims; page 4, lines 16 to 22; page 26, line 6 to page	1-4,27-30, 40-45
Y	30, line 10 & JP, 9-510874, A Claims; page 23, lines 1 to 5; page 36, line 13 to page	5-13,31-39
	39, line 14 & EP, 752874, A1 & US, 5686278, A & MX, 9604240, A1 & AU, 9521979, A & KR, 97702065, A	
X	HENENBERG, H., et al., 'Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells',	1-4,27-30, 40-45
Y	NATURE MEDICINE, 2(6), 1996, pp.876-882	5-13,31-39
X	WO, 97/31656, A1 (Dnavec Research Inc.), 04 September, 1997 (04.09.97), Claims; Abstract; page 4 line 7 to page 6, line 20	1-4,27-30, 42-45
Y	(Family: none)	5-13,31-41
PX	WO 00/01836, A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.) 13 January, 2000 (13.01.00),	1-5,8-11,27-31 ,34-37,40-45
PY	Claims (Family: none)	6,7,12,13,32,3 3,38,39
PX	Ikunoshin Kato, "Fibronectin no Riyô ni yoru Zouketsu Kansaibou eno Kou Kouritsu Idenshi Dounyuuhou", Idenshi	1-5,8-11,27-31 ,34-37,40-45
PY	Igaku, 3(2), May, 1999, pp.114-119	6,7,12,13,32, 33,38,39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01533

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14-26,40-45

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The whole inventions as set forth in claims 14 to 26 and parts of inventions as set forth in Claims 40 to 45 relating to "therapeutic methods" pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
(Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT)

Parts of inventions as claimed in 40 to 45 other than "therapeutic methods" relate to a subject matter to be searched by the International Searching Authority.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ A61K48/00 //A61K31/70, 35/12, 35/28, 35/30, 38/02, 38/16, 38/19, 38/22, 38/43, 39/395		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ A61K48/00, 31/70, 35/12-35/30, 38/02-38/43, 39/395		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), JICST (JOIS), WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	右田 真ら, 「レトロウイルスベクターによる造血幹細胞への遺伝子導入の至適条件の検討-骨髓ストローマ細胞とフィブロネクチンフラグメント(CH-296)の比較-」, 国立精神・神経センター運営部企画室編, 『平成9年度厚生省精神・神経疾患研究委託費による研究報告集(2年度班・初年度班)』, 1998, p. 401	1-13, 27-41, 44, 45
Y		42, 43
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 23.05.00	国際調査報告の発送日 06.06.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 今村 玲 英 子 印	4C 9736 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 10-507074, A (ニューロテック エス エイ) , 14. 7月. 1998 (14. 07. 98) , 特許請求の範囲, 第6頁第3-5行,	1-7, 27-33, 40-45
Y	& WO, 96/11278, A1, & EP, 787197, A1, & FR, 2726005, A1, & AU, 9536575, A, & NZ, 293994, A	8-13, 34-39
X	WO, 95/31566, A1 (VIAGENE, INCORPORATED) , 23. 11月. 1995 (23. 11. 95) , 特許請求の範囲, 第25頁第30行-第28頁第18行,	1-5, 8-11, 27-31, 34-37, 40-45
Y	& JP, 9-509329, A, 特許請求の範囲, 第44頁第3行-第47頁第3行, & EP, 759087, A1, & AU, 9525896, A	6, 7, 12, 13, 32, 33, 38, 39
X	US, 5830880, A (Hoechst Aktiengesellschaft) , 3. 11月. 1998 (03. 11. 98) , 特許請求の範囲, 第11欄第37行-第12欄第29行,	1-5, 8-11, 27-31, 34-37, 40-45
Y	& JP, 10-506526, A, 特許請求の範囲, 第26頁最下行-第28頁8行, & WO, 96/06940, A1, & EP, 804601, A1, & AU, 9534732, A, & FI, 9700768, A, & KR, 97705638, A	6, 7, 12, 13, 32, 33, 38, 39
X	EP, 870839, A1 (TAKARA SHUZO CO. LTD.) , 14. 10月. 1998 (14. 10. 98) , 特許請求の範囲, 第12頁第26-56行,	1-5, 8-11, 27-31, 34-37, 40-45
Y	& WO, 97/18318, A1, 特許請求の範囲, 第33頁第16行-第35頁第9行, & MX, 9803706, A1, & AU, 6975058, A & CN, 1207774, A	6, 7, 12, 13, 32, 33, 38, 39
X	J P, 10-505234, A (ヘキスト、アクチエンゲゼルシャ フト) , 26. 5月. 1998 (26. 05. 98) , 特許請求の範囲, 第21頁12行-第23頁第14行,	1-5, 8-11, 27-31, 34-37, 42-45
Y	& WO, 96/06939, A1, & EP, 777740, A1, & AU, 9535185, A	6, 7, 12, 13, 32, 33, 38-41
X	WO, 95/26200, A1 (INDIANA UNIVERSITY FOUNDATION), 5. 10月. 1995 (05. 10. 95) , 特許請求の範囲, 第4頁第16-22行, 第26頁第6行-第30頁第10行,	1-4, 27-30, 40-45
Y	& JP, 9-510874, A, 特許請求の範囲, 第23頁第1-5行, 第36頁第13 行-第39頁第14行, & EP, 752874, A1, & US, 5686278, A, & MX, 9604240, A1, & AU, 9521979, A, & KR, 97702065, A	5-13, 31-39
X	HENENBERG, H., <i>et al.</i> , 'Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells',	1-4, 27-30, 40-45
Y	NATURE MEDICINE, 2(6), 1996, pp. 876-882	5-13, 31-39

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 97/31656, A1 (株式会社ディナベック研究所), 4. 9月. 1997 (04. 09. 97), 特許請求の範囲, 要約, 第4頁第7行—第6頁第20行 (ファミリーなし)	1-4, 27-30, 42-45
Y		5-13, 31-41
PX	WO, 00/01836, A1 (寶酒造株式会社), 13. 1月. 2000 (13. 01. 00), 特許請求の範囲 (フ ァミリーなし)	1-5, 8-11, 27-31, 34-37, 40-45
PY		6, 7, 12, 13, 32, 33, 38, 39
PX	加藤郁之進, 「フィブロネクチンの利用による造血幹細胞への高効 率遺伝子導入法」, 遺伝子医学, 3(2), May 1999, pp. 114-119	1-5, 8-11, 27-31, 34-37, 40-45
PY		6, 7, 12, 13, 32, 33, 38, 39

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14-26, 40-45 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲14-26に係る発明の全体及び40-45に係る発明のうち「治療方法」とされる部分は、手術又は治療による人体の処置方法である。
（PCT 17条(2)(a)(i)、PCT規則39.1(iv)）
なお、請求の範囲40-45のうち「治療方法」以外の部分は国際調査の対象となる。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。